

대한민국특허청  
KOREAN INTELLECTUAL  
PROPERTY OFFICE

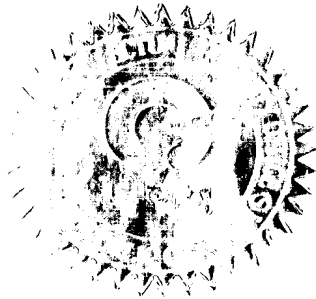
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0043016  
Application Number

출원년월일 : 2002년 07월 22일  
Date of Application JUL 22, 2002

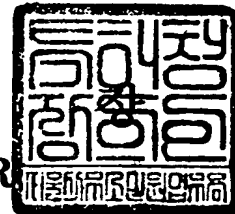
출원인 : 김송배  
Applicant(s) KIM, SONG BAE



2003      년      06      월      07      일

특      허      청

COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】 명세서 등 보정서  
 【수신처】 특허청장  
 【제출일자】 2002.08.03

## 【제출인】

【성명】 김송배  
 【출원인코드】 4-1998-013105-1  
 【사건과의 관계】 출원인

## 【대리인】

【성명】 최규팔  
 【대리인코드】 9-1998-000563-8

## 【대리인】

【성명】 이은선  
 【대리인코드】 9-1998-000423-1

## 【사건의 표시】

【출원번호】 10-2002-0043016  
 【출원일자】 2002.07.22  
 【심사청구일자】 2002.07.22  
 【발명의 명칭】

헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1→2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1→4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드 또는 그를 함유하는 백두옹 추출물의 고형암 치료제로서의 용도

## 【제출원인】

【접수번호】 1-1-02-0233619-11  
 【접수일자】 2002.07.22

## 【보정할 서류】

명세서등

## 【보정할 사항】

【보정대상항목】 별지와 같음

【보정방법】 별지와 같음

【보정내용】 별지와 같음

## 【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인  
 최규팔 (인) 대리인  
 이은선 (인)



1020020043016

출력 일자: 2003/6/9

**【수수료】**

**【보정료】** 0 원

**【추가심사청구료】** 0 원

**【기타 수수료】** 0 원

**【합계】** 0 원

**【첨부서류】**

1. 보정내용을 증명하는 서류[보정된  
특허청구범위]\_1통



【보정대상항목】 식별번호 27

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명에 따른 백두옹 추출물이나 그로부터 분리된 순수 물질 SB365는 고형암 세포에 대하여 세포독성을 거의 나타내지 않음에도 불구하고, 동물실험에서 우수한 항암 효과를 나타내는 점을 특징으로 한다. 그러므로 임상에서 사용하고 있는 기존 항암제들이 혈액세포 감소를 통해 면역기능을 저하시키는 문제점을 개선할 수 있으며, 조혈세포 등과 같이 세포분열 속도가 빠른 세포에 대하여 작은 독성을 보일 것으로 기대된다.

【보정대상항목】 청구항 8

【보정방법】 삭제



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0006
【제출일자】	2002.07.22
【발명의 명칭】	헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드 또는 그를 함유하는 백두옹 추출물의 고휘암 치료제로서의 용도
【발명의 영문명칭】	Use of hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside or extracts from Pulsatillae radix containing the same as therapeutic agents for solid tumors
【출원인】	
【성명】	김송배
【출원인코드】	4-1998-013105-1
【대리인】	
【성명】	최규팔
【대리인코드】	9-1998-000563-8
【대리인】	
【성명】	이은선
【대리인코드】	9-1998-000423-1
【발명자】	
【성명】	안병준
【출원인코드】	4-1998-007414-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김용
【성명의 영문표기】	KIM,Yong
【주민등록번호】	690102-1405116
【우편번호】	301-822
【주소】	대전광역시 중구 선화1동 12-4번지 1통 5반
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	김송배
【출원인코드】	4-1998-013105-1



1020020043016

출력 일자: 2003/6/9

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인

최규팔 (인) 대리인

이은선 (인)

【수수료】

【기본출원료】

20 면 29,000 원

【가산출원료】

5 면 5,000 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

9 항 397,000 원

【합계】

431,000 원

【감면사유】

개인 (70%감면)

【감면후 수수료】

129,300 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)\_1통 2. 위임장\_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 헤데라게닌 3-*O*- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드(hederagenin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside) 또는 그를 함유하는 백두옹(Pulsatillae radix) 추출물의 고형암(solid tumors) 치료제로서의 용도에 관한 것이다.

**【대표도】**

도 4

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드 또는 그를 함유하는 백두옹 추출물의 고형암 치료제로서의 용도{Use of hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside or extracts from Pulsatillae radix containing the same as therapeutic agents for solid tumors}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1은 분획 WT의 실리카겔 TLC 패턴을 보여주는 도면이고;

도 2는 세파덱스(Sephadex) LH20 칼럼 분획 SPX3의 실리카겔 TLC 패턴을 보여주는 도면이며;

도 3은 분획 SPX3의 HPLC 크로마토그램이고;

도 4는 SB365의 HPLC 크로마토그램이다.

## 【발명의 상세한 설명】

## 【발명의 목적】

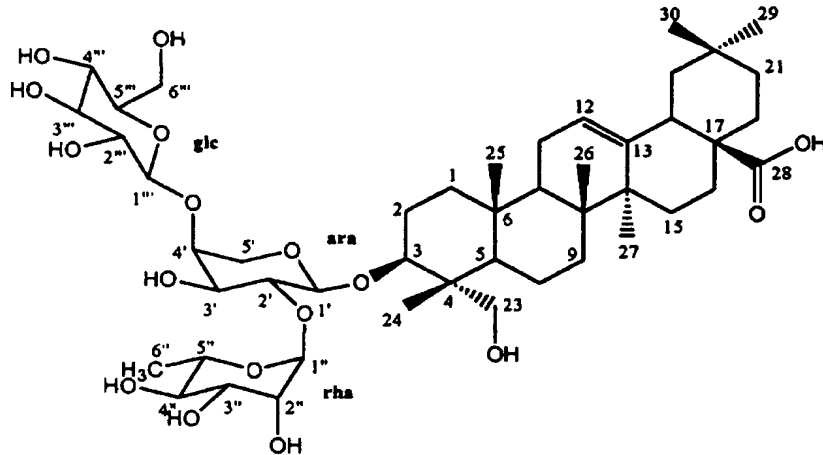
## 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<5> 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드(hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside) 또는



그를 함유하는 백두옹 추출물의 고형암(solid tumors) 치료제로서의 용도에 관한 것이다:

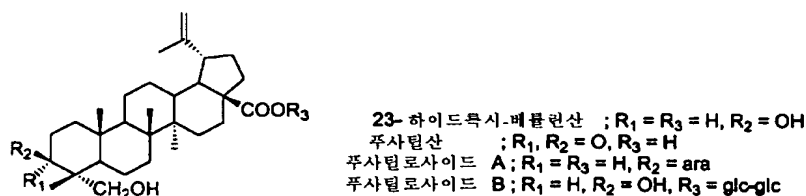
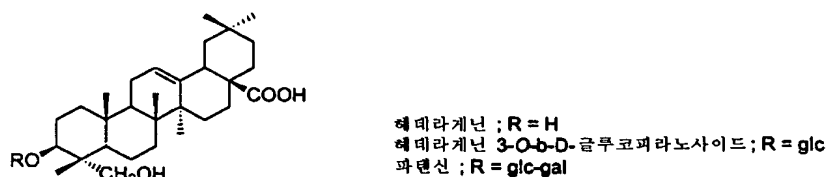
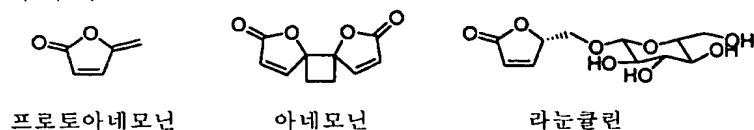
<6> 【화학식 1】



<7> 백두옹(白頭翁; *Pulsatillae radix*)은 미나리아재비과(*Ranunculaceae*)에 속하는 할미꽃(*Pulsatilla koreana*)(배기환, 한국의 약용식물, 1999)의 뿌리를 건조한 것이다. 한방에서 백두옹은 청열, 양혈, 해독의 효능이 있는 것으로 알려져 있고 소염, 수렴, 지혈, 지사약으로서 열독성 혈리, 말라리아, 비출혈, 치출혈, 인종(咽腫)의 치료제로 사용되어 왔다. 그 꽃을 백두옹화(白頭翁花)라고 하여 학질, 두창(頭瘡)을 치료하는데 사용하며, 그 잎을 백두옹엽(白頭翁葉)이라고 하여 요슬통풍(腰膝風痛), 부종, 심장통을 치료하는데 사용한다. 또한, 백두옹을 물로 달인 액은 아메바성 적리균에 대한 항균작용이 있고, 트리코모나스에 대해 살충작용이 있는 것으로 보고되어 있다.

<8> 백두옹에는 약 9%의 사포닌(saponins)이 함유되어 있으며, 현재까지 분리된 성분들은 하기 화학식 2에 나타낸 바와 같은 프로토아네모닌(protoanemonin), 아네모닌(anemonin), 라누쿨린(ranunculin), 헤데라게닌(hederagenin), 베틀린산(betulinic acid) 및 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체와 그 배당체 등이 있다:

## &lt;9&gt; 【화학식 2】



<10> 지금까지 위 성분들의 작용에 대하여 그다지 많은 연구가 이루어지지 않는바, 프로토아네모닌은 유사분열독성(mitotoxicity)을 갖는 것으로 보고되어 있으며 (Vonderbank, F., *Pharmazie*, 5, 210, 1950), Li 등(Li, R. Z. 등, *Yao Hsueh Hsueh Pao* . 28, 326 31, 1993)은 라눈쿨린이 KB 세포 등에 대해 세포독성을 나타내며, 그 세포독성 기전은 DNA 중합효소 저해라고 보고한 바 있다.

<11> 한편, 헤데라게닌 3-O-α-L-람노피라노실(1→2)-[β-D-글루코피라노실(1→4)]-α-L-아라비노피라노사이드는 Shimizu 등(*Chem. Pharm. Bull.*, 26, 1666, 1978)이 *Pulsatilla cerna*와 *P. koreana*로부터, Yoshihiro 등(*J. Nat. Pro.*, 62, 1279, 1999)이 *P. chinensis*로부터, 그리고 Ekabo 등(*J. Nat. Prod.*, 59, 431, 1996)은 *Serjania salzmanniana* Schlecht로부터 분리한 바 있으며, 강 등(*Arch. Pharm. Res.*, 12(1), 42-47, 1989)이 *P. koreana*로부터 이미 분리하여 그 구조를 재확인한 바 있다.

Yoshihiro 등은 위 문헌에서 헤데라게닌 유도체 및 올레아놀산 유도체 등이 HL-60 인간

백혈병(leukemia) 세포에 대해 세포독성을 갖는다고 보고하였다. 이들은 중국 할미꽃 뿌리로부터 분리한 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드가 HL-60 세포에 대하여 ED<sub>50</sub> 3.8  $\mu$ g/ml의 약한 세포독성을 나타낸다고 보고하였다. 그러나 이 정도의 세포독성은 대다수의 사포닌과 많은 종류의 천연물들이 나타내는 일반적인 정도의 것으로서, 이것을 근거로 상기 물질이 항암효과를 갖는다고 말할 수는 없다. 이와 같이, 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드가 항암 효과, 특히 고형암에 대한 항암 효과를 갖는다는 사실은 지금까지 전혀 알려진 바 없었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<12> 본 발명자들은 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffman), 백두옹을 비롯한 수종의 생약으로부터 데옥시포도필로톡신(deoxypodophyllotoxin)을 분리해내어, 이 물질이 혈관신생(angiogenesis) 억제에 의해 고형암 세포의 성장을 억제한다는 사실을 밝혀내고, 한국 특허 제315,200호를 이미 획득한 바 있다. 본 발명자들은 생약으로부터 또 다른 항암 물질을 찾아내기 위하여 지속적인 연구를 수행하던 중, 백두옹으로부터 유기용매에는 잘 녹지 않으면서 물에는 잘 녹는 분획을 얻어 그로부터 항암 물질을 분리해내고, 본 발명을 완성하였다.

<13> 따라서 본 발명의 목적은 유효성분으로서, 백두옹으로부터 분리된 항암 물질 또는 그를 함유하는 백두옹 분획을 포함하는, 고형암 치료제를 제공하기 위한 것이다.

## 【발명의 구성 및 작용】

- <14> 첫째, 본 발명은 유효성분으로서, 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드를 함유하는 백두옹 추출물을 포함하는 고형암 치료제에 관한 것이다.
- <15> 본 발명에서, 고형암이란 혈액암을 제외한 모든 덩어리로 이루어진 암을 가리키며, 그 대표적인 예로 폐암을 들 수 있다.
- <16> 본 발명에 있어서, 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드를 함유하는 백두옹 추출물은 백두옹을 에탄올 수용액으로 추출한 후 아세톤을 가하여 침전시켜 수용성 분획(WT)을 제조함으로써 얻을 수 있다. 또는, 백두옹을 에탄올 수용액으로 추출한 후 아세톤을 가하여 침전시켜 수용성 분획을 얻고, 이를 세파덱스(Sephadex) LH20 칼럼을 통과시켜, Rf가 0.48~0.5이고 황산 분무 후 가열 시 적색을 나타낸 후 청색을 나타내는 분획(SPX3)을 제조함으로써 얻을 수 있다.
- <17> 둘째, 본 발명은 유효성분으로서, 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드를 포함하는 고형암 치료제에 관한 것이다.
- <18> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <19> 본 발명에서는, 백두옹을 50% 에탄올로 추출한 후 그 중 아세톤에 용해되지 않는 WT 분획을 얻고, 이를 세파덱스 LH20 상에서 더욱 정제하여 SPX3 분획을 얻었으며, 이로부터 최종적으로 순수 물질인 SB365를 얻었다. 이 물질은 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피

라노실(1→2)-[β-D-글루코피라노실(1→4)]-α-L-아라비노피라노사이드로서, 마우스 폐암 세포인 LLC(Lewis Lung Carcinoma) 세포 또는 인체 폐암 세포인 NCI-H23 세포로 발생시킨 고형암에 대하여 임상 약물인 아드리아마이신(adriamycin) 보다 우수한 항암 효과를 나타낸다.

<20> 이상과 같이, 백두옹으로부터 항암 분획을 제조하고 그로부터 항암 물질을 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 거친다.

<21> (1) 백두옹으로부터 항암 분획 WT의 제조

<22> 백두옹 분말을 50% 에탄올 수용액으로 추출하고 감압 하에서 건조하였다. 얻어진 건조물에 5~10 배량의 아세톤을 가하여 흔들어 준 후, 3000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 얻었다. 이 침전물에 대하여 상기 조작을 2 회 반복하였다. 최종적으로 얻은 침전물은 물에 잘 용해되므로 분획 WT로 표시하였다. 이 분획은 LLC 세포를 이식한 BDF1 마우스 및 NCI-H23을 이식한 누드 마우스에 대한 항암성 측정 결과 비교적 높은 항암성을 나타내었다.

<23> (2) 분획 WT로부터 분획 SPX3의 제조

<24> 분획 WT로부터 일정량을 취하여 여러 농도의 메탄올 수용액 일정량에 용해시킨 후, 동일한 용매로 안정화시킨 세파덱스 LH20 칼럼에 가하고 분획을 행하였다. 이 때 80% 메탄올 수용액 사용 시 분리 효과가 가장 좋았으며, 분획 WT 500 mg을 취한 경우 칼럼의 채운 크기는 60×4 cm가 적합하였다. 그 결과, 분획 SPX1(시험관 번호 66-91), SPX2(시험관 번호 66-91), SPX3(시험관 번호 91-111) 및 SPX4(시험관 번호 111-138)를 얻었다. 그 중 SPX3는 황산 분무 후 가열 시 처음에는 적색을 나타내다가 시간이 경과하면 청색

을 나타내며, Rf 값이 0.48~0.50인 반점을 주 물질로 하는 분획으로서, LLC 세포를 이식한 BDF1 마우스 및 NCI-H23을 이식한 누드 마우스에 대한 항암성 측정 결과 높은 항암성을 갖는 것으로 나타났다.

<25> (3) 분획 SPX3로부터 활성 물질 SB365의 단리

<26> 항암성을 나타낸 SPX3 분획으로부터 항암 물질을 단리하기 위하여, HPLC를 수행하여 순수한 물질 SB365를 얻었다. SB365의 구조를 확인하기 위하여, 리베르만-부흐카르트(Liebermann-Burchard) 반응, IR,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR 및 에탄올/황산 가수분해를 수행한 결과, SB365는 백두옹에서 이미 분리된 바 있는 사포닌 성분인 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드인 것으로 밝혀졌다.

<27> 본 발명에 따른 백두옹 추출물이나 그로부터 분리된 순수 물질 SB365는 고형암 세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않음에도 불구하고, 동물실험에서 우수한 항암 효과를 나타내는 점을 특징으로 한다. 그러므로 임상에서 사용하고 있는 기존 항암제들이 혈액세포 감소를 통해 면역기능을 저하시키는 문제점을 개선할 수 있으며, 조혈세포 등과 같이 세포분열 속도가 빠른 세포에 대하여 작은 독성을 보일 것으로 기대된다.

<28> 본 발명의 백두옹 추출물과 SB365는 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 배합하여 약제학적 분야에서 통상적인 제제, 예를 들면 액제, 현탁제 등의 경구투여용 제제, 주사용 용액 또는 현탁액, 또는 주사 시 주사용 증류수로 재조제하여 사용할 수 있는 즉시 사용형 주사용 건조분말 등과 같은 형태의 주사용 제제, 연고제, 크림제, 액제 등의 국소적용형 제제 등과 같은 다양한 제제로 제형화할 수 있다. 특히, 본 발명의 활성성분은 수용성이므로, 생리식염수, 링거액, 영양제 등의 다양한 수액에 용해시켜

간편하게 사용될 수 있다. 이러한 약제학적 제제는 예를 들면 정맥내, 피하, 복강내 투여 또는 국소적용될 수 있다.

<29> 본 활성 성분의 사람에 대한 추천 용량은 SB365의 경우 3.5~8.0 mg/kg 체중이고, SPX3의 경우 20~40 mg/kg 체중이며, WT의 경우 200~300 mg/kg 체중이다. 최적 용량은 WT의 경우 250 mg/kg 체중이고, SPX3의 경우 25 mg/kg 체중이며, SB365의 경우 6.5 mg/kg 체중이다. 그러나 상기 투여 용량은 투여 대상의 나이, 체중, 식이, 건강상태, 질병의 중증도 등을 고려하여 적의 증감될 수 있다.

<30> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 구체적으로 설명하나, 이들에 의해 본 발명의 범위가 어떤 식으로든지 제한되는 것은 아니다.

#### <31> 실시예 1: WT 분획의 제조

<32> 백두옹 분말 50 g을 50% 에탄올 수용액 500 ml로 3 회 추출하고 감압 하에서 건조하여 건조물 22 g을 얻었다. 이 건조물에 아세톤 300 ml를 가하여 흔들어 준 후 3000 rpm에서 원심분리하여 상정액을 제거하고 침전물을 얻었다. 이 침전물에 대하여 상기 조작을 2 회 반복한 후, 아세톤 층은 버리고 불용분을 건조하여 건조물(WT 분획) 17.8 g을 얻었다. 얻어진 WT 분획에 대하여 실리카겔 TLC를 수행하였으며(전개용매; 부탄올:아세트산:물=4:1:1, 색반응; 황산을 분무한 후 가열함), 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에서, R<sub>f</sub> 값이 0.48~0.50 사이에 있는 청색 반점이 후술하는 작용물질에 해당한다. WT 분획은 하기 실험예 1에 나타난 바와 같이, LLC 세포를 이식한 BDF1 마우스에 대해

비교적 높은 항암 활성(암성장 억제율(inhibition rate of tumor growth): 57%)을 나타내었다.

### <33> 실시예 2: SPX 분획의 제조

<34> 분획 WT 560 mg을 메탄올:물=80:20을 사용하여 세파덱스 LH20 칼럼(200 g, 60×4 cm)에서 유출속도를 1 분당 1 ml, 분획량을 한 개의 튜브당 0.5 ml로 하여 분획을 행하였다. 이들 분획을 차례대로 실리카겔 박막 상에 점적한 후 전개하여 분획을 나누었다(전개용매; 부탄올:아세트산:물=4:1:1, 색반응; 황산을 분무한 후 가열함). 그 결과로도 2에 나타내었다. 도 2에서, SPX1(139 mg, 24.8%)은 시험관 번호 26~66을 모은 것으로 주 반점은 4 개이고 아래 것은 황산과 황색으로 반응한다. SPX2(344 mg, 61.4%)는 시험관 번호 66~91을 모은 것으로 2 개의 주 반점으로 구성되는 분획이다. SPX3(61 mg, 10.9%)는 시험관 91~111을 모은 것이며 황산 분무 후 가열시 처음에는 적색을 나타내다가 시간이 경과하면 청색을 나타내며, Rf 값이 평균적으로 0.48~0.50 사이에 있는 반점을 주 물질로 하는 분획이다. SPX4(15.7 mg, 2.8%)는 시험관 111~138을 모은 분획이며, SPX3 와 SPX4는 박막 상에서는 한 개의 반점을 보이는 비교적 순도가 높은 분획들이다.

<35> 하기 실험예 1에 나타낸 바와 같이, SPX3는 투약 후 15 일째에 암성장 억제율 60%를 보임으로써 강한 항암성을 나타내었으며, SPX1, SPX2 및 SPX4는 작용이 없는 것으로 보아 황산에 대해 청색 반응을 나타내는 물질이 항암 물질임을 추정할 수 있었다. 이러한 SPX3 분획은 그 자체로 항암제로 사용할 수 있다.



## &lt;36&gt; 실시예 3: SB365의 단리

<37> SPX3 분획으로부터 순수 물질을 분리하기 위하여 아래와 같이 HPLC를 행하였다.

즉, 고정상으로는 실리카겔(RP-C<sub>18</sub>, 250×10 mm, Metachem사)을, 이동상으로는 메탄올:물 = 80:20을 사용하고, 검출파장은 210 nm, 유속은 1 ml/분이었다. 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, SPX3는 3 개의 주 물질로 구성되어 있다. 실제 분획량으로 보면 rt 8.5 분, 10.4 분의 피크는 소량의 물질을 함유하고 있었으며, rt 23.3 분의 피크에 해당하는 물질이 주 물질이었다. 그러므로 후자가 항암 물질일 가능성이 크다고 생각하였다. 이와 같이 활성 물질일 가능성이 높고 황산에 청색으로 반응하는 23.3 분대의 물질을 포집하여 SPX3 31 mg으로부터 SB365 2.8 mg을 얻었다. 포집한 23.3 분대의 분획을 건조한 후 순도를 확인하기 위하여 동일한 조건 하에서 다시 HPLC를 수행하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었으며, 이로부터 SB365가 순수한 물질임이 확인되었다. 이렇게 하여 얻은 SB365를 하기 구조 동정 및 항암 실험에 직접 사용하였다.

<38> 하기 실험에 1 및 2에 나타낸 바와 같이, SB365는 LLC 세포를 이식한 BDF1 마우스 및 NCI-H23 세포를 이식한 누드마우스에서 각각 81% 및 82.1%의 암성장 억제율을 나타내어 우수한 항암 활성을 나타내었다.

## &lt;39&gt; 실시예 4: 활성 물질 SB365의 구조 동정 및 확인

<40> 상기에서 분리한 물질 SB365는 m.p. 239~241 °C,  $[\alpha]_D^{25} = +23.6^\circ$  (c, 0.2, MeOH)의 백색 무정형으로 리베르만-부카르트 반응에서 양성으로 나타난 것으로 보아 배당체로 확

인되었다. 또한, IR( $\text{cm}^{-1}$ )에서는 3400(br, -OH), 2940(br, C-H), 1695(C=O), 1455, 1040(C-O)에서 관찰되었으며, 1000-1100, 3000-3400상의 흡수대를 보면 배당체일 가능성이 큰 것으로 판단하였다.

<41>  $^1\text{H}$ -NMR을 보면 전형적인 사포닌의 NMR 패턴을 따르고 있으며, 6 개의  $-\text{CH}_3$ 기들이 0.91, 0.92, 0.98, 1.00, 1.07, 1.21 ppm에서 관찰되었고, 또 하나의  $-\text{CH}_3$ 기가 1.64 ppm에서 더블렛(doublet)으로 관찰되었는데 이로부터 구성 당 중 1 개의 램노스가 존재할 것으로 추정되었으며, 아노머 프로톤(anomeric proton)이 6.25(br.), 5.11(1H,  $J=7.80$  Hz)와 4.97 ppm(1H,  $J=6.66$  Hz)에서 관찰되었다. 따라서 SB365는 3 개의 당이 결합된 배당체인 것으로 확인되었다.

<42>  $^{13}\text{C}$ -NMR에서는 65.4 ppm(C-23)에서 하이드록시메틸기가 관찰되었으며 3 개의 아노머 탄소 시그널들이 각각 140.2(C-1'), 106.7(C-1''), 101.7 ppm (C-1')에서, 두 개의 올레핀 탄소가 122.5 ppm(C-12)과 144.8 ppm(C-13)에서 관찰되었고, 하나의 카복시 탄소가 180.2 ppm(C-28)에서 관찰되었다. 통상적으로 28 위치에 당이 결합될 때 약 4 Hz의 글리코실화 업필드 쉬프트(glycosylation upfield shift)가 나타나지만(180.2 ppm  $\rightarrow$  176.2 ppm), 이 화합물에서는 위와 같은 현상이 발견되지 않은 것으로 보아 28 위치에 당이 결합된 배당체는 아닌 것으로 확신할 수 있었다.

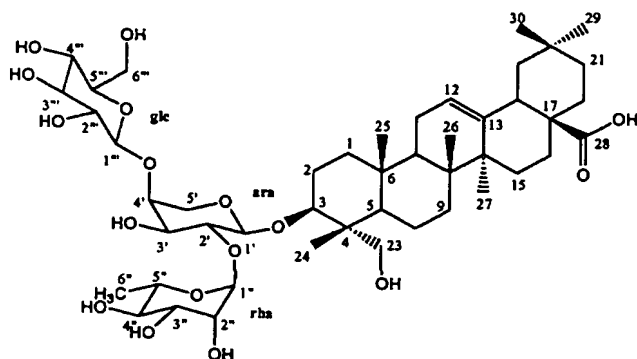
<43> 다음으로 당의 구성과 아글리콘(aglycone)의 구조를 확인하기 위하여 에탄올/황산에서 가수분해를 수행하였다. 가수분해 산물인 아글리콘의 물리화학적 데이터와  $^{13}\text{C}$ -NMR과  $^1\text{H}$ -NMR을 비교해본 결과 SB465가 헤데라게닌임을 확인하였다. 또한, 가수분해된 당은 비교 TLC에 의하여 램노스, 아라비노스 및 글루코스인 것으로 확인되었다.

<44>        이상의 결과와 발표된 문헌의 데이터를 종합 분석한 결과, SB365는 본 식물로부터 이미 분리된 바 있는 사포닌인, 헤데라게닌 3-*O*- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드임을 확인하였다.

<45>        SB365의  $^1\text{H}$ -NMR 및  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터는 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

<46>

【표 1】



위치	<sup>1</sup> H (ppm)	J (Hz)	<sup>13</sup> C (ppm)	위치	<sup>1</sup> H (ppm)	J (Hz)	<sup>13</sup> C (ppm)
C-1			38.9	Arabinose			
C-2			26.1	C-1'	4.97 d	6.66	140.2
C-3	3.28 d	10.9	81.0	C-2'			80.4
C-4			43.5	C-3'			75.4
C-5			48.1	C-4'			76.2
C-6			18.1	C-5'			63.9
C-7			32.8	Rhamnose			
C-8			39.7	C-1''	6.25 br		101.7
C-9			47.8	C-2''			72.3
C-10			36.9	C-3''			72.4
C-11			23.9	C-4''			74.1
C-12	5.45 s		122.5	C-5''			69.6
C-13			144.8	C-6''	1.64	5.94	18.6
C-14			42.1	Glucose			
C-15			28.3	C-1'''	5.11 d	7.80	106.7
C-16			23.8	C-2'''			75.0
C-17			46.2	C-3'''			78.5
C-18			41.9	C-4'''			71.2
C-19			46.4	C-5'''			78.8
C-20			30.9	C-6'''			62.5
C-21			34.2				
C-22			33.2				
C-23	4.36, 3.67	overlap	65.4				
C-24	1.07 s		14.0				
C-25	0.91 s		16.0				
C-26	0.98 s		17.4				
C-27	1.21 s		26.3				
C-28	-		180.2				
C-29	0.92 s		32.8				
C-30	1.00 s		23.7				

<47> 실험예 1: LLC 세포를 이식한 BDF1 마우스에 대한 항암활성

<48> 실험에 사용한 마우스 종은 BDF1 마우스로 수컷 중 체중 18~25 g에 속하는 건강한 것이었다. 이들 동물을 23~24 ℃로 온도 조절이 된 곳에서 물과 먹이를 제한 없이 공급하고 사료는 항생제 무첨가 마우스용을 사용하여 사육하였다. C57BL/6 마우스의 피하에 14 일간 배양된 LLC 세포를 함유한 조직을 취한 후 조직 1 g당 5 ml의 멸균된 냉 생리식염수를 가하여 세포 현탁액을 제조하였다. 이 세포 현탁액 0.2 ml를 BDF1 마우스의 서혜부에 피하로 이식하였다.

<49> 이식 후 24 시간부터 각 군을 5 마리로 나눈 후, 시료를 생리식염수에 용해시킨 후 WT는 280 mg/kg, SPX 분획들은 각각 70 mg/kg(SPX1), 171 mg/kg(SPX2), 30.5 mg/kg (SPX3) 및 8.1 mg/kg(SPX4), SB365는 6.4 mg/kg으로 복강내 주사하였다. 음성 대조군에는 생리식염수만을, 양성 대조군에는 아드리아마이신(0.5 mg/kg 체중)을 주사하였다. 주사 일정은 암 이식 24 시간 후부터 매일 1 회 7 일간 투여한 후 하루 휴약하고, 다시 6 일간 연속적으로 투여하였다. 마우스에 대한 SB365의 독성을 측정하기 위해 1 주일에 2 회 몸무게를 측정하였으며, 항암 효과는 약물 투여 14 일 및 15일에 대조군과 약물 처치군의 암 부피를 측정한 후 다음과 같이 계산하였다.

<50> 암 부피(mm<sup>3</sup>)=길이(mm)×폭<sup>2</sup>(mm<sup>2</sup>)/2

<51> 암성장 억제율(%)=(C-T)×100/C

<52> (C; 대조군의 평균 암 부피, T; 시료 투약군의 평균 암 부피)

<53> 그 결과를 표 2에 나타내었다.

## &lt;54&gt; 【표 2】

백두옹 분획과 SB365의 LLC 세포를 이식한 BDF1 마우스에 대한 암성장 억제율(IR, %)

분획 및 물질	마우스 수	암성장 억제율(%)	
		14 일 <sup>a)</sup>	15 일
WT	5	56	55
SPX1	5	10	12
SPX2	5	25	30
SPX3	5	57	60
SPX4	5	8	10
SB365	5	82	79
아드리아마이신	5	60	64

&lt;55&gt; a): 암세포 이식 후 일수

<56> 표 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 WT와 SPX3 분획은 암세포 이식 후 15 일째에 55% 및 60%의 암성장 억제율을 나타내었고, SB365는 아드리아마이신의 64% 보다도 높은 79%의 암성장 억제율을 나타내었다.

## &lt;57&gt; 실험예 2: NCI-H23 세포를 이식한 누드 마우스에 대한 항암활성

<58> 실험동물로는 5 주령의 체중 16~25 g인, 미국 Harlan사의 암컷 누드 마우스를 사용하였다. 실험동물은 1 주일 이상 무균 동물실에서 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 동물실의 온도는  $22 \pm 2$  °C, 습도는  $55 \pm 5\%$ 이었고, 명암은 12 시간 주기로 자동 조절하였다. 실험동물용 고형 사료는 방사선 멸균 제품이었으며 음수는 고압증기멸균기로 멸균하였다. 사료와 음수는 자유 섭취시켰다. 세포주는 미국 국립암연구소(NCI)에서 공급받아 생명공학연구소에서 보존중인 인체 암세포주를 사용하였다.

<59> 인체 암세포 중 폐암 세포인 NCI-H23를 누드 마우스에 이식하였다.  $3 \times 10^7$  세포/ml의 암세포를 마우스 20 g당 0.3 ml씩 피하로 이식하였다. 시료는 1.6, 3.2, 6.4 mg/kg

의 농도(0.032, 0.064, 0.128 mg/20 g 체중)로 처리하였는데, 암세포 이식 후 8 일째를 제외하고 1 일부터 14 일까지 13 일 동안 매일 복강으로 주사하였다. 처리 기간 중 형성된 종양의 크기는 개체별로 측정하였으며 처리 동물의 체중 변화도 측정하였다. 암세포 이식 후 16 일째에 누드 마우스를 희생시켜 종양을 분리하여 무게를 측정하였다. 양성 대조군에는 아드리아마이신을 0.5 mg/kg 체중의 용량으로 첫째 날부터 1, 5, 9 및 14 일째 되는 날에 복강으로 투여하였다. 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

<60> 【표 3】

SB365의 NCI-H23 세포를 이식한 누드 마우스에서의 암성장 억제율(IR, %)

그룹	NCI-H23에 대한 암성장 억제율 (%)				
	음성 대조군	아드리아마이신 (0.5 mg/kg)	SB365 (1.6 mg/kg)	SB365 (3.2 mg/kg)	SB365 (6.4 mg/kg)
16 일 <sup>a)</sup>	-	61.5	40.1	52.3	82.1

<61> a): 암세포 이식 후 일수

<62> 표 3에 나타낸 바와 같이, SB365는 6.4 mg/kg으로 투여 시 암세포 이식 후 16 일째에 82.1%에 달하는 높은 암성장 억제율을 나타내었다.

<63> 실험예 3: 세포독성 실험

<64> 실험에 사용한 암세포인 A549, SK-MEL-2 및 MCF7은 생명공학연구소에서 분양 받아 사용하였다. 배양액은 멸균 주사용 증류수에 L-글루타민이 포함된 RPMI 1640 배지 한 봉지, 50 °C 수조에서 30 분간 가열하여 불활성화시킨 우태아혈청(FBS) 100 ml, NaHCO<sub>3</sub> 2 g, 페니실린 10만 단위, 스트렙토마이신 100 mg을 가하여 용해시킨 후, 0.1 N 염산으로 pH를 조절하여 전체를 1 ℓ가 되게 하고 세균 여과하여 제조하였으며, 4 °C에서 보관하면서 사용하였다. 세포는 3 일에 한 번씩 계대(propagation)하여 유지하였으며, 세

포를 부착면으로부터 분리하기 위하여 인산 완충 식염수(PBS)에 0.5% 트립신과 2% EDTA를 녹인 용액을 사용하였다.

<65> 암세포에 대한 독성실험은 1989년에 미국 국립암연구소에서 약물의 *in vitro* 항암 활성을 측정하기 위하여 개발된 설향로다민(sulforrhodamine)-B(SRB)법을 사용하였다. 실험에 사용할 세포들을 0.5% 트립신-EDTA 용액으로 부착면으로부터 분리시키고  $3 \sim 5 \times 10^4$  세포/ml의 세포 현탁액을 제조한 후, 96 웰 플레이트의 각 웰에 180  $\mu$ l씩 가하여 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 시간 배양하였다. 시료는 디메틸설폭사이드(DMSO)에 녹여 실험에 필요한 농도까지 실험용 배지 또는 3차 증류수로 희석하여 최종 DMSO의 농도가 0.2% 이하가 되도록 단계별로 희석하였다. 96 웰 플레이트의 각 웰에 단계별 농도로 희석한 시료를 각각 20  $\mu$ l씩 넣어준 후, 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48 시간 배양하였다. 시료를 가한 시점에서 Time zero(Tz) 플레이트를 수집하였다. Tz 플레이트 및 배양이 끝난 후 각 플레이트의 배지를 제거하고 10% 트리클로로아세트산(TCA)을 각 웰당 50  $\mu$ l씩 가하여 4  $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 방치하여 세포들을 플레이트의 바닥면에 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난 후 플레이트를 물로 5~6 회 세척하여 남아 있는 TCA 용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 플레이트는 웰당 50  $\mu$ l의 1% 아세트산 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색 용액을 가하여 30 분간 세포를 염색하고 다시 1% 아세트산 용액으로 수회 세척하여 세포에 결합하지 않은 SRB를 모두 제거하였다. 이렇게 염색한 후 플레이트를 다시 실온에서 건조시켰다. 여기에 10 mM 트리스 용액 100  $\mu$ l를 가해 염료를 녹여 마이크로플레이트 리더로 520 nm에서 광학 밀도(O.D.) 값을 측정하였다. 암세포에 대한 ED<sub>50</sub>(50% effective dose) 값은 다음과 같이 계산하였다. 시료를 가하여 배양을 시작하는 시간에 수집하여 SRB 단백질 양을 측정하



여 그 값을  $T_z$ 로 하였다. 즉, 초기의 살아 있는 세포수를 초기값( $T_z$ )으로 정하였다. 시료를 처리하지 않고 배양한 O.D. 값을 대조군(C)으로 하고 시료를 처리하고 배양한 웰의 O.D. 값을 약물 처리된 실험값(T)으로 하였다.  $T_z$ , C 및 T로부터 다음의 수식에 의해 물질들의 세포독성 정도를 측정하였다. 즉  $T_z \geq T$ 인 경우에는  $(T - T_z) / (C - T_z) \times 100$ 의 수식으로 계산하고  $T_z < T$ 인 경우에는  $(T - T_z) / T_z \times 100$ 의 수식으로 계산하였다. 이렇게 계산된 값들로부터 로터스 프로그램의 데이터 회귀 기능을 이용하여 약물의 암세포 성장을 50% 억제하는 농도인  $ED_{50}$  값을 계산하여 각 물질들의 세포독성 정도를 비교하였다.

<66> 분리한 물질은 A549 사람 폐암 세포에 대하여는  $ED_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ , 살마의 흑색종 세포인 SK-MEL-2에 대하여는  $ED_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ , 및 사람의 유방암 세포인 MCF7에 대하여는  $ED_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ 를 나타내어, 사실상 고형암 세포에 대한 세포독성은 없는 것으로 판단되었다.

<67> 제제예 1: WT 분획을 함유하는 주사용 용액의 제조

<68> 실시예 1에서 얻은 WT 분획 250 mg을 생리식염수 10 ml에 용해시켜 주사용 용액을 제조하였다.

<69> 제제예 2: SPX3 분획을 함유하는 주사용 건조분말의 제조

<70> 실시예 2에서 얻은 SPX3 분획 25 mg을 링거액 10 ml에 용해시킨 후 동결건조하여 즉시 사용형 주사용 건조분말을 제조하였다. 이 분말은 주사 시 주사용 증류수로 재조제하여 사용한다.

<71> 제제예 3: SB365를 함유하는 주사용 용액의 제조

<72> 실시예 3에서 얻은 SB365 6.5 mg을 링거액 10 ml에 용해시켜 주사용 용액을 제조하였다.

**【발명의 효과】**

<73> 본 발명에 따른 백두옹 분획 WT 및 SPX3, 및 이로부터 분리된 SB365, 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드는 고형암 세포에 대하여 높은 암성장 억제율을 나타낼 뿐 아니라, 수용성이므로 생리식염수, 링거액 또는 영양제와 같은 다양한 수액에 용해시켜 간편하게 사용될 수 있으며, 세포독성이 낮아 기존 항암제의 부작용을 경감시킬 수 있어, 고형암에 대한 치료제로서 매우 유용할 것으로 기대된다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

유효성분으로서, 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드를 함유하는 백두옹(*Pulsatillae radix*) 추출물을 포함하는 고형암 치료제.

**【청구항 2】**

제1항에 있어서, 백두옹 추출물이 백두옹을 에탄올 수용액으로 추출한 후 아세톤을 가하여 침전시켜 얻은 수용성 분획인 치료제.

**【청구항 3】**

제2항에 있어서, 백두옹 추출물을 1 일 용량 200~300 mg/kg 체중으로 투여하는 치료제.

**【청구항 4】**

제1항에 있어서, 백두옹 추출물이 백두옹을 에탄올 수용액으로 추출한 후 아세톤을 가하여 침전시켜 수용성 분획을 얻고, 이를 세파덱스(Sephadex) LH20 칼럼을 통해 통과시켜 얻은, Rf가 0.48~0.50이고, 황산 분무 후 가열 시 적색을 나타낸 후 청색을 나타내는 분획인 치료제.

**【청구항 5】**

제4항에 있어서, 백두옹 추출물을 1 일 용량 20~40 mg/kg 체중으로 투여하는 치료제.

**【청구항 6】**

유효성분으로서, 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드를 포함하는 고형암 치료제.

**【청구항 7】**

제6항에 있어서, 헤데라게닌 3-O- $\alpha$ -L-람노피라노실(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-글루코피라노실(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-아라비노피라노사이드를 1 일 용량 3.5~8 mg/kg 체중으로 투여하는 치료제.

**【청구항 8】**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 고형암이 폐암인 치료제.

**【청구항 9】**

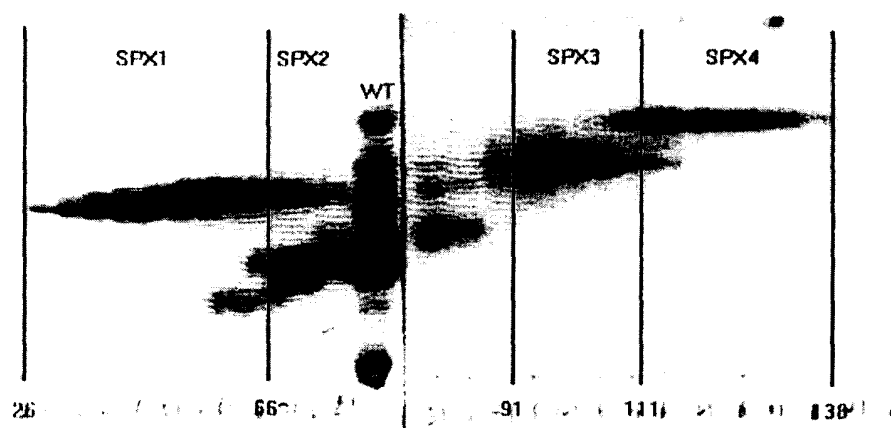
제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 생리식염수, 링거액 및 영양제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 수액에 용해시켜 투여하는 치료제.

【도면】

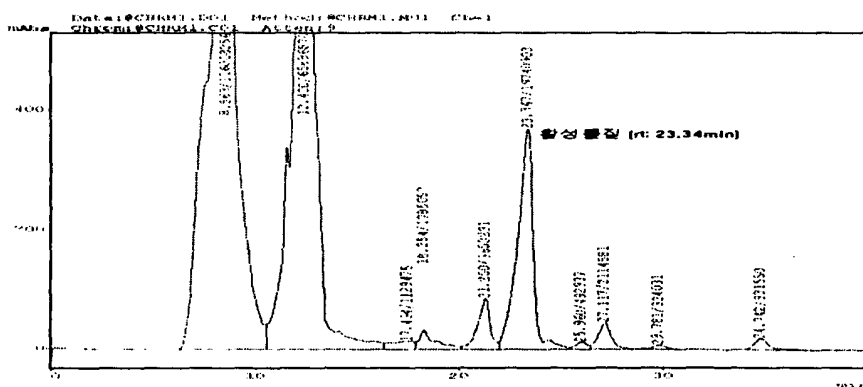
【도 1】



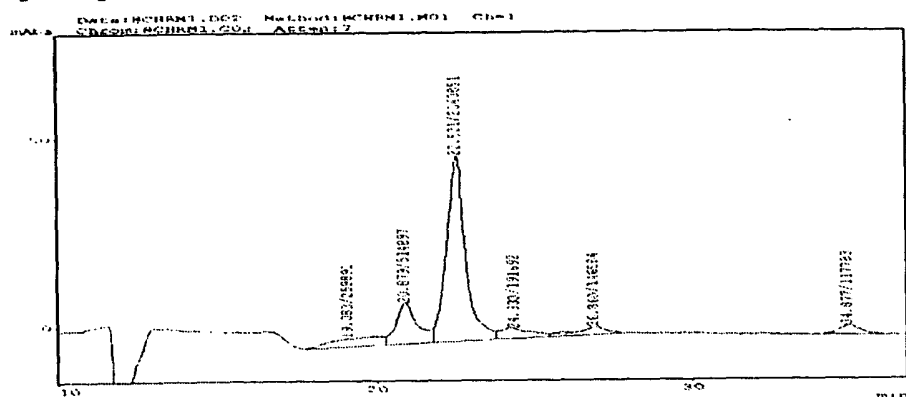
【도 2】



【도 3】



【도 4】



**KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE**

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

Application Number : 2002-43016

Date of Application : July 22, 2002

Applicant(s) : KIM, Song-Bae

COMMISSIONER

[Bibliographic Item]

[Type of Document] Amendment

[Receptor] Commissioner of the Korean Intellectual Property Office

[Submit Date] August 3, 2002

[Applicant]

[Name] KIM, Song-Bae

[Code] 4-1998-013105-1

[Agent]

[Name] CHOI, Kyu-Pal

[Agent's Code] 9-1998-000563-8

[Agent]

[Name] LEE, Eun-Sun

[Agent's Code] 9-1998-000423-1

[Indication of the case]

[Application No.] 10-2002-0043016

[Date of Application] July 22, 2002

[Date of Examination] July 22, 2002

[Title] Use of hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$  2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$  4)]-  $\alpha$ -L-arabinopyranoside or extracts from Pulsatillae radix containing the same as therapeutic agents for solid tumors

[Reason of Submit]

[Receipt No.] 1-1-02-0233619-11

[Receipt Date] July 22, 2002

[Document to be Amended] Specification

[Items to be Amended]

[Contents to be Amended] As attached

[Method of Amendment] As attached

[Purpose] An Amendment is hereby submitted pursuant to Article 13 of the Patent Law and Article 8 of the Utility Model Law.



Agent CHOI, Kyu-Pal (seal)  
Agent LEE, Eun-Sun (seal)

[Fees]

[Amendment]	0	Won
[Additional Examination Fee]	0	Won
[Others]	0	Won
[Total]	0	Won

[Attachment]

1. Amended Document

[Items to be Amended] Id. No. 27

[Method of Amendment] Correction

[Contents of Amendment]

The Pulsatillae radix extracts according to the present invention or pure SB365 compound isolated therefrom have a weak cytotoxicity against solid tumor cells, but unexpectedly showed excellent antitumor activity in animal experiments. Thus, they can improve problems caused by previous antitumor agents on clinical use, e.g. reducing immune responses due to decreasing blood cells. It is also anticipated that they show low toxicity on rapidly dividing cells like hematopoietic cells, *etc.*

[Items to be Amended] Claim 8

[Method of Amendment] Delete

[Bibliographic Item]

[Document Name] Patent Request

[Type of Right] Patent

[Receptor] Commissioner of the Korean Intellectual Property Office

[Reference No.] 0006

[Filing Date] July 22, 2002

[Title of Invention] Use of hederagenin 3-0- $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside or extracts from Pulsatillae radix containing the same as therapeutic agents for solid tumors

[Applicant's Name] **KIM, Song-Bae**

[Applicant's Code] 4-1998-013105-1

[Agent's Name] **CHOI, Kyu-Pal**

[Agent's Code] 9-1998-000563-8

[Agent's Name] **LEE, Eun-Sun**

[Agent's Code] 9-1998-000423-1

[Inventor's Name] **AHN, Byung-Zun**

[Applicant's Code] 4-1998-007414-1

[Inventor's Name] **KIM, Yong**

[Identification No.] 690102-1405116

[Postal Code No.] 301-822

[Address] #1-5, 12-4, Seonwha 1-dong, Joong-gu,  
Taejeon, Republic of Korea

[Citizen] Republic of Korea

[Inventor's Name] **KIM, Song-Bae**

[Applicant's Code] 4-1998-013105-1

[Request for Examination] Request

[Purpose] A Patent Application, pursuant to Article 42 of the Patent Law, and Request for Examination, pursuant to the provision of Article 60 of the Patent Law, are hereby filed.

Agent	CHOI, Kyu-Pal	(Seal)
Agent	LEE, Eun-Sun	(Seal)

[Fees]

[Basic Filing Fee]	20	sheets	29,000	Won
[Additional Filing Fee]	5	sheets	5,000	Won
[Priority Claiming Fee]	0	case	0	Won
[Request for Examination Fee]	9	claims	397,000	Won
[Total]			431,000	Won
[Reason of Reduction]	Individual Person (70%)			
[Total Fee including Reduction]	129,300		Won	

[Attachment]

1. Abstract and Specification (Drawings)
2. Power of Attorney

## [ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]

## [Abstract]

This invention relates to a use of hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl((1 $\rightarrow$ 2)-  
[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside or a Pulsatillae radix extract  
5 containing the same as a therapeutic agent for solid tumors.

## [Representative drawing]

Fig. 4

## [SPECIFICATION]

[Title of the invention]

Use of hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl((1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside or an extract from *Pulsatillae radix* containing the same as a therapeutic agent for solid tumors

[Brief description of the drawings]

Fig. 1 shows silica gel TLC patterns of fraction WT;

Fig. 2 shows silica gel TLC patterns of fraction SPX3 purified on a Sephadex LH20 column;

Fig. 3 is an HPLC chromatogram of fraction SPX3; and,

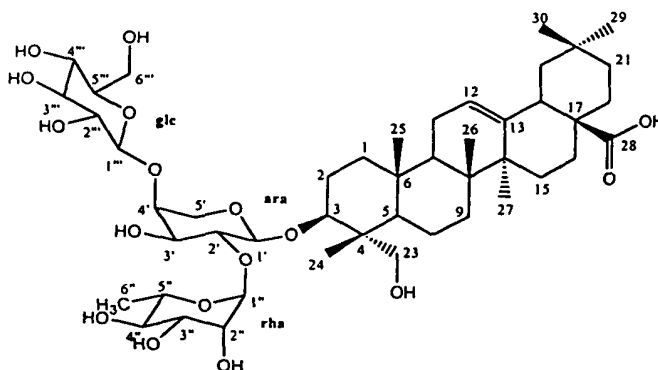
Fig. 4 is an HPLC chromatogram of SB365.

[Detailed description of the invention]

[Purpose of the invention]

[Technical field to which the invention pertains and prior arts in the field]

This invention relates to a use of hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl((1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside as represented by the following formula (I):

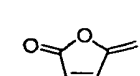


or an extract from *Pulsatillae radix* containing the same as a therapeutic agent for solid tumors.

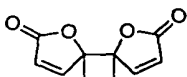
*Pulsatillae radix* is a dried root of *Pulsatilla koreana* belonging to the Ranunculaceae family (Ki Hwan Bae, Korean Medicinal Herbs, 1999). According to the Chinese medicine, *Pulsatillae radix* is known to have effects of removing heat from the

blood and detoxifying. It has also been used as anti-inflammatory, astringent, hemostatic and antidiarrhea agents, and for the treatment of hematochezia, malaria, nosebleed, and bleeding from tooth. Its flower is called as Pulsatillae Flos, and used for the treatment of malaria, or smallpox. Its leaf is called as Pulsatillae Folium, and used for treatment of waist pain, edema, or heart pain. In addition, decoction of Pulsatillae radix was reported to have an antibacterial effect against amoebic dysentery, and a pesticidal effect against *Trichomonas*.

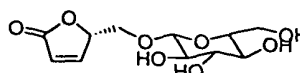
Pulsatillae radix contains about 9% of saponins, and such ingredients as protoanemonin, anemonin, ranunculin, hederagenin, betulinic acid, and oleanolic acid derivatives and their glycosides have been isolated therefrom by now as represented by the following formula (II):



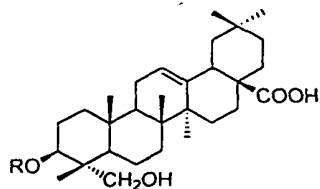
Protoanemonin



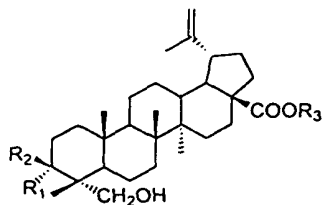
anemonin



Ranunculin



Hederagenin ; R = H  
 Hederagenin 3-O-b-D-glucopyranoside ; R = glc  
 Patensin ; R = glc-gal



23-Hydroxy-betulinic acid ; R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH  
 Pusallic acid ; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = O, R<sub>3</sub> = H  
 Pusaltilloside A ; R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = ara  
 Pusaltilloside B ; R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = glc-glc

The above ingredients have not yet been extensively studied for their pharmacological effects, but protoanemonin was reported to have mitotoxicity (Vonderbank, F., *Pharmazie* 5, 210, 1950). Li, *et al.* (Li, R. Z., *et al.*, *Yao Hsueh Hsueh Pao.* 28, 326 31, 1993) also reported that ranunculin has cytotoxicity against KB cells, by

Hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside was isolated from *Pulsatilla cerna* and *P. koreana* by Shimizu, *et al.* (Chem. Pharm. Bull., 26, 1666, 1978); from *P. chinensis* by Yoshihiro, *et al.* (J. Nat. Pro., 62, 1279, 1999); and from *Serjania salzmanniana* Schlecht by Ekabo, *et al.* (J. Nat. Prod., 59, 431, 1996). Kang, *et al.* (Arch. Pharm. Res., 12(1), 42-47, 1989) also isolated it from *P. koreana*, and reconfirmed its structure. Yoshihiro, *et al.* reported that hederagenin and hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside have cytotoxicity against HL-60 human leukemia cells in the above article. They reported that hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside isolated from Chinese Pulsatillae radix has 1 week cytotoxicity, i.e. 3.8  $\mu$ g/ml of ED<sub>50</sub>, against HL-60 cells. However, most of saponins and many kinds of natural products commonly show such level of cytotoxicity, and thus, the above compound cannot be said to have antitumor activity based thereon. Therefore, it has never been known that hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside has antitumor activity, particularly, against solid tumors.

[Technical tasks to be solved by the invention]

The present inventors isolated deoxypodophyllotoxin from medicinal herbs including *Anthriscus sylvestris* Hoffman, Pulsatillae radix, etc., and found that this substance inhibited the growth of solid tumor cells by inhibiting angiogenesis, and obtained a Korean patent (Korean Patent Number 315,200) for the same. The present inventors carried out extensive studies to develop an antitumor agent from medicinal herbs. As a result, they obtained a fraction which is poorly soluble in an organic solvent, but is readily soluble in water from Pulsatillae radix, and isolated an antitumor compound from the fraction, and so completed the present invention.

[Constitution and action of the invention]

Accordingly, the purpose of the present invention is to provide a therapeutic agent for solid tumors comprising an antitumor compound isolated from *Pulsatillae radix* or a fraction from *Pulsatillae radix* containing the same as an active ingredient.



One aspect of the present invention provides a therapeutic agent for solid tumors comprising a Pulsatillae radix extract containing hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside as an active ingredient.

“Solid tumors”, as used herein, refer to any mass tumor except blood cancers, a representative example of which is lung tumor.

In the present invention, the Pulsatillae radix extract containing hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside can be obtained by extracting Pulsatillae radix with an aqueous solution of ethanol, and forming precipitates by adding acetone thereto to obtain a water-soluble fraction (WT). Or, it can be obtained by extracting Pulsatillae radix with the aqueous solution of ethanol, forming precipitates by adding acetone thereto to obtain the water-soluble fraction, and passing the fraction through Sephadex LH20 column to obtain a fraction (SPX3) having  $R_f$  of 0.48~0.5, and developing red color, and then, blue color upon spraying sulfuric acid followed by heating (SPX3).

Another aspect of the present invention provides a therapeutic agent for solid tumors comprising hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside as an active ingredient.

Hereinafter, the present invention will be explained in detail.

According to the present invention, Pulsatillae radix extract is extracted with 50% ethanol to obtain a fraction WT being hardly soluble in acetone, and the fraction is further purified on Sephadex LH20 to obtain fraction SPX3, and from the SPX3 fraction, pure SB365 is finally obtained. This compound is hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside, and exhibits

higher antitumor activity against solid tumors formed with mouse lung tumor cells, LLC (Lewis Lung Carcinoma) cells, or human lung tumor cells, NCI-H23 cells, than a clinical drug, adriamycin.

In particular, the present process for preparing an antitumor fraction from Pulsatillae radix and isolating an antitumor substance therefrom is as follows.

#### (1) Preparation of antitumor fraction WT from Pulsatillae radix

Pulsatillae radix powder extracted with 50% aqueous solution of ethanol, and dried under reduced pressure. To the obtained dried material was added acetone at 5 to 10-fold amount. The mixture was shaken, centrifuged at 3,000 rpm, and the supernatant was therefrom to obtain an insoluble part. The above process was repeated twice. The insoluble part was readily soluble in water, and so designated as "fraction WT". This fraction showed relatively high antitumor activity against BDF1 mice transplanted with LLC cells and nude mice transplanted with NCI-H23 cells.

#### (2) Preparation of fraction SPX3 from fraction WT

A given amount of fraction WT is dissolved in a given amount of aqueous solution of methanol at various concentrations, and then fractionated on Sephadex LH20 column stabilized with the same solvent. In this case, the best isolation is achieved with employing 80% aqueous solution of methanol, and the suitable size of the filled column was 60×4 cm for 500 mg of fraction WT. As a result, fraction SPX1 (test tube numbers 26-66), SPX2 (test tube numbers 66-91), SPX3 (test tube numbers 91-111), and SPX4 (test tube numbers 111-138) were obtained. When spraying sulfuric acid onto the fractions on a plate and heating the plate, the fraction SPX3 developed red color at first, and blue color with the lapse of time, and contains a spotted compound having  $R_f$  of 0.48 to 0.50 as a main ingredient. It was shown to have high antitumor activity on

BDF1 mice transplanted with LLC cells and nude mice transplanted with NCI-H23 cells.

### (3) Isolation of SB365 from fraction SPX3

5 To isolate an antitumor substance from the fraction SPX3 showing antitumor activity, HPLC was carried out to obtain pure compound, SB365. To identify the structure of SB365, Lieberman-Burchard reaction, IR,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, and ethanol/sulfuric acid hydrolysis were carried out. As a result, SB365 was confirmed as hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-  
10 arabinopyranoside, which is a saponin ingredient that had already been isolated from Pulsatillae radix.

The Pulsatillae radix extract according to the present invention or pure SB365 compound isolated therefrom do not have cytotoxicity against solid tumor cells, but  
15 unexpectedly showed excellent antitumor activity in animal experiments. Thus, they can improve problems caused by previous antitumor agents on clinical use, e.g. reducing immune responses due to decreasing blood cells. It is also anticipated that they show low toxicity on rapidly dividing cells like hematopoietic cells, etc.

20 The Pulsatillae radix fractions and SB365 according to the present invention may be combined with pharmaceutically acceptable carriers that are conventionally used, and manufactured into various formulations that are conventional in the pharmaceutical field, for example, orally administrable formulations like solutions, suspensions, etc.; injectable formulations like injectable solution or suspension, ready-to-use injectable dry powder,  
25 etc.; and topically administrable formulations like ointments, creams, and solutions. Particularly, the active ingredient of the present invention is soluble in water, and may be dissolved in various solutions such as physiological saline, Ringer's solution, and nutrient solution, etc. Such pharmaceutical formulations may be intravenously, subcutaneously, intraperitoneally, or topically administered.

A recommended dosage of the active ingredient of the present invention to human beings is 3.5~8.0 mg/kg body weight in case of SB365, 20~40 mg/kg body weight in case of fraction SPX3, or 200~300 mg/kg in case of fraction WT. The optimal dosage is 6.5 mg/kg body weight in case of SB365, 25 mg/kg body weight in case of fraction SPX3, or  
5 250 mg/kg body weight in case of fraction WT. However, such dosage may be appropriately adjusted depending on age, body weight, health, severity of disease of patients.

This invention will be better understood from the following examples. One  
10 skilled in the art will readily appreciate the specific materials and results described are merely illustrative of, and are not intended to, nor should be intended to, limit the invention as described more fully in the claims, which follow thereafter.

#### **Example 1: Preparation of fraction WT**

15 Pulsatillae radix powder of 50 g was extracted three times with 500 ml of 50% aqueous solution of ethanol, and the extract was dried under reduced pressure to obtain 22 g of dried materials. To this dried material was added 300 ml of acetone, and the mixture was shaken and centrifuged at 3,000 rpm. The supernatant was removed therefrom to  
20 give a precipitate. For the precipitate, the acetone treatment was repeated twice. The acetone layer was removed, and the insoluble part was dried to obtain 17.8 g of dried materials (fraction WT). The obtained fraction WT was subjected to silica gel TLC (developing solvent: butanol : acetic acid : water in the ratio of 4 : 1 : 1, color reaction: sulfuric acid-spraying followed by heating). The result is shown in Fig. 1. In Fig. 1, a  
25 blue spot having the  $R_f$  in the range of 0.48 to 0.50 corresponds to the active ingredient of the present invention as described below. As shown in Experimental Example 1 below, fraction WT showed relatively high antitumor activity (inhibition rate of tumor growth: 57%) on BDF1 mice transplanted with LLC cells.

#### **30 Example 2: Preparation of fractions SPX**

Fraction WT of 560 mg was further fractionated on Sephadex LH20 column (200 g, 60×4 cm) using a mixed solution of methanol and water (80:20) with the flow rate of 1 ml/min, and the fraction volume of 0.5 ml/tube. These fractions were spotted on a silica gel thin layer in order, and developed to obtain fractions (developing solvent: butanol : acetic acid : water in the ratio of 4 : 1 : 1, color reaction: sulfuric acid-spraying followed by heating). The result is shown in Fig. 2. In Fig. 2, SPX1 (139 mg, 24.8%) was obtained by collecting test tube numbers 26 to 66, and consisted of 4 major spots, lower one of which developed yellow color upon reacting with sulfuric acid. SPX2 (344 mg, 61.4%) was obtained by collecting test tube numbers 66 to 91, and consisted of 2 major spots. SPX3 (61 mg, 10.9%) was obtained by collecting test tube numbers 91 to 111, and developed red color at first, and then blue color with the lapse of time, upon spraying sulfuric acid followed by heating. Fraction SPX3 contained ... having the ... in the range of 0.48 to 0.50 as its major ingredient. SPX4 (15.7 mg, 2.8%) was obtained by collecting test tube numbers 111 to 138. Fractions SPX3 and SPX4 had relatively high purity showing one spot on the thin layer.

As shown in Experimental Example 1 below, SPX3 exhibited 60% of the inhibition rate of tumor growth on 15 days from its administration. By contrast, SPX1, SPX2, and SPX4 did not exhibit any action, and so it could be assumed that the substance developing blue color against sulfuric acid was an ingredient with antitumor activity. This SPX3 fraction may be used as an antitumor agent in itself.

### Example 3: Isolation of SB365

25

In order to isolate a pure substance from fraction SPX3, HPLC was carried out as follows.

... silica gel (RP-C<sub>18</sub>, 250×10 mm, manufactured by Metachem) was used as the fixed phase, and a mixed solution of methanol and water (80:20) was used as

30

the mobile phase. The detection wavelength was 210 nm, and the flow rate was 1 ml/min. The result is shown in Fig. 3. As shown in Fig. 3, SPX3 consisted of 3 major substances. From the obtained fractionated amounts, peaks at  $R_t$  of 8.5 min and 10.4 min contained small amounts of ingredients, and a peak at  $R_t$  of 23.3 min contained the major ingredient. Thus, it was assumed that the latter would have antitumor activity. As described above, the substance with  $R_t$  of 23.3 min that developed blue color with sulfuric acid and would be the active ingredient was collected to obtain SB365 of 2.8 mg from 31 mg of SPX3. The collected fraction at  $R_t$  of 23.3 min was dried, and was subjected to HPLC under the condition as described above to measure its purity. The result is shown in Fig. 4. From Fig. 4, it was confirmed that SB365 was a pure substance. The obtained SB365 was directly used for the structural identification and antitumor activity test below.

As shown in Experimental Examples 1 and 2 below, SB365 exhibited 81% and 82.1% of the inhibition rate of tumor growth on BDF1 mice transplanted with LLC cells and nude mice transplanted with NCI-H23 cells, respectively, which could be said to be excellent antitumor activities.

#### **Example 4: Structural identification and confirmation of the active compound SB365**

SB365 isolated in the above was the white amorphous form with m.p. 239~241 °C and  $[\alpha]_D +23.6^\circ$  (c, 0.2, MeOH), and was positive in Liebermann-Buchard reaction, and so confirmed as a glycoside. In addition, according to IR ( $\text{cm}^{-1}$ ), peaks were observed at 3400 (br, -OH), 2940 (br, C-H), 1695 (C=O), 1455, and 1040 (C-O). It was also assumed as a glycoside from the absorption peaks in the ranges of 1000-1100 and 3000-3400.

In view of  $^1\text{H-NMR}$ , it had NMR patterns typical of saponins. Six  $-\text{CH}_3$  groups were observed at 0.91, 0.92, 0.98, 1.00, 1.07, and 1.21 ppm, and another  $-\text{CH}_3$  group was observed as doublet at 1.64 ppm. It could be seen from this that the compound comprised one rhamnose group in its sugar groups. Anomeric protons were observed at 6.25 (br.), 5.11 (1H,  $J=7.80$  Hz), and 4.97 ppm (1H,  $J=6.66$  Hz). Therefore, SB365 was confirmed

as a glycoside having three sugar groups.

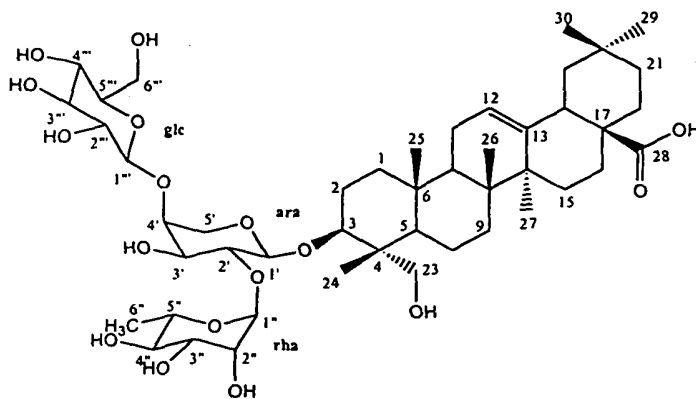
According to  $^{13}\text{C}$ -NMR, a hydroxymethyl group was observed at 65.4 ppm (C-23), and three anomeric carbon signals were observed at 140.2 (C-1'), 106.7 (C-1''), and 101.7 ppm (C-1'). Two olefinic carbons were observed at 122.5 ppm (C-12) and 144.8 ppm (C-13), and one carboxy carbon was observed at 180.2 ppm (C-28). In general, about 4 Hz of glycosylation upfield shift is shown when sugar is bound at the 28 position (180.2 ppm  $\rightarrow$  176.2 ppm). In the present compound, the above phenomenon was not observed, and so it was confirmed that the compound does not have a sugar group in the 28 position.

Subsequently, the compound was hydrolyzed in ethanol/sulfuric acid to identify its sugar groups and the structure of aglycone. SB365 was confirmed as hederagenin after comparing physicochemical data of the hydrolysis product, aglycone,  $^{13}\text{C}$ -NMR, and  $^1\text{H}$ -NMR data. Further, the hydrolyzed sugars were confirmed as rhamnose, arabinose, and glucose by comparative TLC.

On the basis of the above analysis results and data in published literatures, SB365 was confirmed as hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl((1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside).

$^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of SB365 are as shown in the following Table 1.

[Table 1]



Position	<sup>1</sup> H (ppm)	J (Hz)	<sup>13</sup> C (ppm)	Position	<sup>1</sup> H (ppm)	J (Hz)	<sup>13</sup> C (ppm)
C-1			38.9	Arabinose			
C-2			26.1	C-1'	4.97 d	6.66	140.2
C-3	3.28 d	10.9	81.0	C-2'			80.4
C-4			43.5	C-3'			75.4
C-5			48.1	C-4'			76.2
C-6			18.1	C-5'			63.9
C-7			32.8	Rhamnose			
C-8			39.7	C-1''	6.25 br		101.7
C-9			47.8	C-2''			72.3
C-10			36.9	C-3''			72.4
C-11			23.9	C-4''			74.1
C-12	5.45 s		122.5	C-5''			69.6
C-13			144.8	C-6''	1.64	5.94	18.6
C-14			42.1	Glucose			
C-15			28.3	C-1'''	5.11 d	7.80	106.7
C-16			23.8	C-2'''			75.0
C-17			46.2	C-3'''			78.5
C-18			41.9	C-4'''			71.2
C-19			46.4	C-5'''			78.8
C-20			30.9	C-6'''			62.5
C-21			34.2				
C-22			33.2				
C-23	4.36, 3.67	overlap	65.4				
C-24	1.07 s		14.0				
C-25	0.91 s		16.0				
C-26	0.98 s		17.4				
C-27	1.21 s		26.3				
C-28	-		180.2				
C-29	0.92 s		32.8				
C-30	1.00 s		23.7				



### Experimental Example 1: Antitumor activity on BDF1 mice transplanted with LLC cells

5           The mouse species used in this experiment was BDF1, and healthy male mice with the body weight of 18~25 g were used. These animals were supplied with water and foods *ad libitum* at a place of controlled temperature in the range of 23~24 °C, and were bred with an antibiotic-free mouse feed. LLC cells were subcutaneously cultured in C57BL/6 mice for 14 days. A LLC cell-containing tissue was taken and thereto was  
10 added sterilized cold physiological saline water (5 ml/g tissue) to prepare a cell suspension. The cell suspension of 0.2 ml was subcutaneously transplanted to the groin region of BDF1 mouse.

From 24 hours after transplantation, the above mice were divided into several  
15 groups consisting of 5 mice. Then, samples, fractions WT and SPX fractions, and SB365, were dissolved in physiological saline, and were injected intraperitoneally at each concentration of 280 mg/kg (WT), 70 mg/kg (SPX1), 171 mg/kg (SPX2), 30.5 mg/kg (SPX3), 8.1 mg/kg (SPX4), and 6.4 mg/kg (SB365). To the negative control group was injected only the physiological saline, and to the positive control group was injected  
20 adriamycin (0.5 mg/kg). The injection was scheduled from 24 hours after tumor transplantation to administer the samples successively once a day for 7 days, and stopped for one day, and then, was carried out for 6 more consecutive days.

In order to evaluate toxicity of SB365 on mice, experimental mice were weighed  
25 twice a week. Antitumor activity was calculated after measuring tumor volume of the control and test groups on 14th and 15th day after sample administration as follows:

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = \text{length (mm)} \times \text{width}^2 \text{ (mm}^2\text{)} / 2$$

$$\text{Inhibition rate of tumor growth (\%)} = (C - T) \times 100 / C$$

(C: average tumor volume in the control group, T: average tumor volume in the  
30 test group)

The result is shown in the following Table 2.

[Table 2]

- 5 Inhibition rate of tumor growth (IR, %) of Pulsatillae radix fractions and SB365 on BDF1 mice transplanted with LLC cells

Fractions or compounds	Number of mice	Inhibition rate of tumor growth (%)	
		14 days <sup>a)</sup>	15 days <sup>a)</sup>
WT	5	56	55
SPX1	5	10	12
SPX2	5	25	30
SPX3	5	57	60
SPX4	5	8	10
SB365	5	82	79
Adriamycin	5	60	64

a) Days after transplantation of tumor cells

10 As shown in the above Table 2, fractions WT and SPX3 showed the inhibition rate of tumor growth of 55% and 60%, respectively, and SB365 showed the inhibition rate of tumor growth of 79%, higher than adriamycin of 64% on 15th days from transplantation of tumor cells.

15 **Experimental Example 2: Antitumor activity on nude mice transplanted with NCI-H23 cells**

Female nude mice of the age of 5 weeks weighing 16~25 g obtained from Harlan Co. (USA) were used as experimental animals in this experiment. The mice were used after acclimation for 1 week in an aseptic animal room. The animal room maintained the temperature of 22±2 °C, the humidity of 55±5%, and the light and darkness cycle of 12 hours, which was automatically controlled. Solid feed for experimental animals was radiosterilized, and drinking water was sterilized in an autoclave. The animals were supplied with feed and drinking water *ad libitum*. A human tumor cell line provided by

National Cancer Institute (NCI), USA, and preserved in the Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Korea, was used. Lung tumor cells, NCI-H23 cells, among the human tumor cells, were transplanted to the nude mice. The tumor cells of  $3 \times 10^7$  cells/ml were subcutaneously transplanted to the mice at a volume of 0.3 ml/20 g body weight. The samples were intraperitoneally injected to the mice every day for 13 days, that is, from 1 day to 14th day except 8th day after tumor cells transplantation. The size of tumor formed during the injection was measured in each animal, and any change in its body weight was also measured. On 16th day after tumor cells transplantation, the nude mice were sacrificed, and the tumor was separated and weighed. To the positive control group was intraperitoneally injected adriamycin of 0.5 mg/kg body weight on 1st, 5th, 9th, and 14th day. The result is shown in the following Table 3.

[Table 3]

Inhibition rate of tumor growth (IR, %) of SB365 on nude mice transplanted with NCI-H23 cells

Group	Inhibition rate of tumor growth (%) on NCI-H23				
	Negative control	Adriamycin (0.5 mg/kg)	SB365 (1.6 mg/kg)	SB365 (3.2 mg/kg)	SB365 (6.4 mg/kg)
16th day <sup>a)</sup>	-	61.5	40.1	52.3	82.1

a): Days after tumor cells transplantation

As shown in the above Table 3, SB365 of 6.4 mg/kg showed a high inhibition rate of tumor growth, 82.1%, on 16th day after tumor cells transplantation.

### Experimental Example 3: Cytotoxicity test

Tumor cells A549, SK-MEL-2, and MCF-7 were obtained from the KRIBB, and used in this experiment. A culture medium was prepared by adding one pack of L-glutamine-containing RPMI1640 medium, 100 ml of fetal bovine serum (FBS) inactivated by heating at a water bath of 50 °C for 30 minutes, 2 g of NaHCO<sub>3</sub>, 100,000 units of

penicillin, and 100 mg of streptomycin, to a sterilized distilled water for injection, adjusting the pH of the mixture with 0.1 N HCl to a total volume of 1 l, and disinfecting the mixture with filtration, and stored at 4 °C before use. The cells were maintained by propagation once every three days, and a solution containing 0.5% trypsin and 2% EDTA  
5 in physiological buffered saline (PBS) was used to detach the cells from wells.

Cytotoxicity on tumor cells was measured according to Sulforhodamine-B (SRB) method developed by the NCI in 1989 to measure *in vitro* antitumor activity of drugs.

10 Specifically, the cells were detached from wells with 0.5% trypsin-EDTA solution and then,  $3\sim5\times10^4$  cells/ml of cell suspension was prepared. Then, the cell suspension (180 µl/well) was added to 96-well plate, and the plate was incubated in an incubator of 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours.

15 The sample was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted with the culture medium or tertiary distilled water to obtain required concentrations for experiment, and serially diluted to a final concentration of DMSO of 0.2% or less. To each well of 96-well plate were added 20 µl of the serially diluted sample solutions, and then, the plate was incubated in an incubator of 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours. At the point of time to add  
20 the sample solution, T<sub>2</sub> (Time zero) plate was collected. Medium was removed from T<sub>2</sub> plate and from each plate after completing the incubation, and to the plates was added 10% trichloroacetic acid (TCA) (50 µl/well). The resulting plates were allowed to stand for 1 hour at 4 °C to immobilize the cells on the bottom of the plates. After completing the cell immobilization, the plates were washed 5~6 times with water to completely remove the  
25 remaining TCA solution, and the resulting plates were dried at room temperature to contain no moisture.

To the completely dried plates was added 50 µl of a staining solution with 0.4% SRB in 1% acetic acid to stain the cells for 30 minutes. Then, the plates were washed  
30 5~6 times with 1% acetic acid solution to completely remove SRB unbound to the cells.

The plates were dried at room temperature. Thereto was added 100 µl of 10 mM Tris solution to dissolve the dye. Then, OD (optical density) value was measured by microplate reader at a wavelength of 520 nm.

5           ED<sub>50</sub> value of the sample on tumor cells (50% effective dose, ng/ml): a concentration at which tumor cell growth is inhibited by 50%) was calculated as follows. T<sub>z</sub> value was defined as OD value at the time of starting the incubation after adding the sample, C (control) value as OD value of the well not treated with the sample, and T (test) value as OD value of the well treated with the sample. From the values T<sub>z</sub>, C, and T, cytotoxicity of the agent was measured by the following formula:

- in the case of  $T_z \geq T$ ,  $(T - T_z) / (C - T_z) \times 100$

- in the case of  $T_z < T$ ,  $(T - T_z) / T_z \times 100$

15           From the values as calculated above, ED<sub>50</sub> value of the sample was obtained by using data regression function of Lotus program.

20           As a result, ED<sub>50</sub> value of SB365 on human lung tumor cells, A549 cells, human melanoma cells, SK-MEL2, and human breast tumor cells, MCF7 was >20 µg/ml, >10 µg/ml, and >10 µg/ml, respectively. Therefore, SB365 had little cytotoxicity on solid tumor cells.

#### **Formulation Example 1: Preparation of an injectable solution containing fraction WT**

25           WT fraction of 250 mg obtained in Example 1 was dissolved in 10 ml of physiological saline to prepare an injectable solution.

#### **Formulation Example 2: Preparation of an injectable dry powder containing fraction SPX3**

SPX 3 fraction of 25 mg obtained in Example 2 was dissolved in 10 ml of Ringer's solution, sterilized and then, freeze-dried to prepare ready-to-use injectable dry powder. This powder would be re-constituted with distilled water for injection before use.

5     **Formulation Example 3: Preparation of an injectable solution containing SB365**

SB365 of 6.5 mg obtained in Example 3 was dissolved in 10 ml of Ringer's solution and sterilized to prepare an injectable solution.

[Effect of the invention]

10             Pulsatillae radix factions WT and SPX3, and SB365, hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl((1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside, isolated from the fractions according to the present invention, not only have a high inhibition rate of tumor growth on solid tumor cells, but also can be conveniently used by dissolving in various solutions including physiological saline, Ringer's solution, or nutrient solution  
15     because it is readily soluble in water, and has low cytotoxicity enough to ameliorate side effects of previously developed anti-tumor agents. Therefore, it is anticipated to be very useful as a therapeutic agent for solid tumors.

## [Claims]

## [Claim 1]

An agent for treating solid tumors, comprising an Pulsatillae radix extract as an active ingredient, wherein the Pulsatillae radix extract contains hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl((1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside.

## [Claim 2]

The agent according to claim 1, wherein the Pulsatillae radix extract is prepared by extracting Pulsatillae radix with an aqueous solution of ethanol, and forming precipitates by adding acetone thereto to obtain a water-soluble fraction.

## 10 [Claim 3]

The agent according to claim 2, wherein the Pulsatillae radix extract is administered at a daily dose of 200 to 300 mg/kg body weight.

## [Claim 4]

The agent according to claim 1, wherein the Pulsatillae radix extract is a fraction having  $R_f$  in the range from 0.48 to 0.50 and developing red color, and then, blue color, upon sulfuric acid spraying followed by heating, which fraction is prepared by extracting Pulsatillae radix with an aqueous solution of ethanol, forming precipitates by adding acetone thereto to obtain a water-soluble fraction, and passing the fraction through a Sephadex LH20 column.

## 20 [Claim 5]

The agent according to claim 4, wherein the Pulsatilla radix extract is administered at a daily dose of 20 to 40 mg/kg body weight.

## [Claim 6]

An agent for treating solid tumors, comprising hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl((1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside as an active ingredient.

## [Claim 7]

The agent according to claim 6, wherein hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl((1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside is administered at a daily dose of 3.5 to 8 mg/kg body weight.

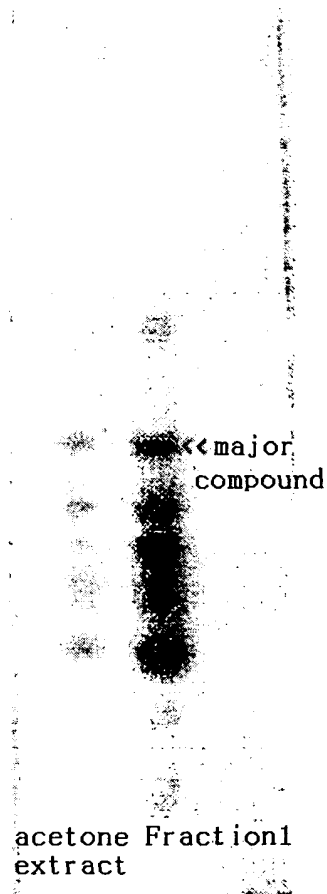
[Claim 8]

The agent according to any one of claims 1 to 7, which is dissolved in a solution selected from the group consisting of physiological saline, Ringer's solution, and nutrient solution, for administration.

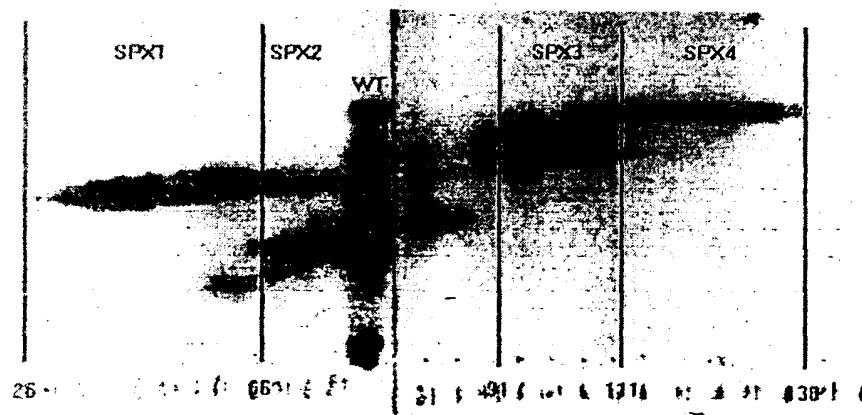


## [DRAWINGS]

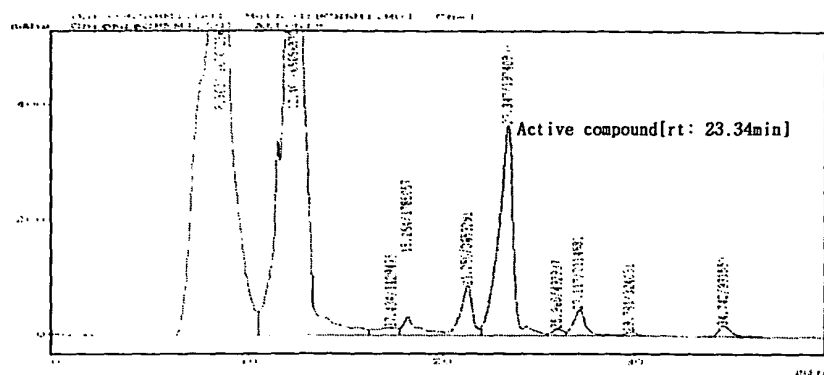
[Fig. 1]



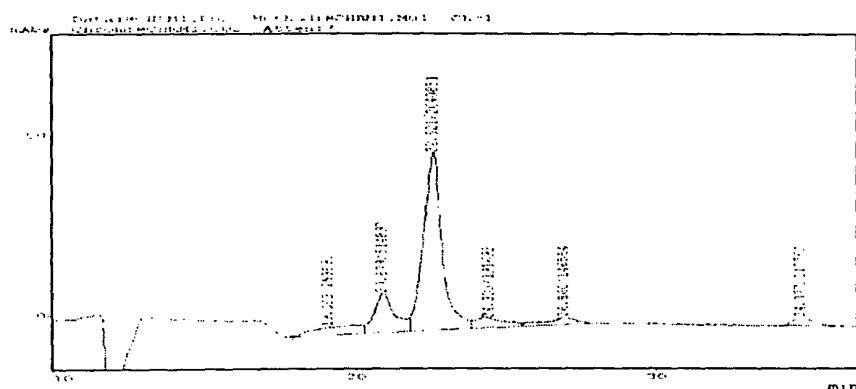
5 [Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



## DECLARATION

I, the undersigned, of 824-11, Yeoksam-dong, Kangnam-ku, Seoul, Korea do solemnly and sincerely declare that I well understand both Korean and English languages and the attached English version is a full, true and faithful translation of the specification and claims of Korean Patent Appln. No. 2002-43016 filed with the Korean Intellectual Property Office on July 22, 2002, entitled "Use of hederagenin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) -[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopyranoside or extracts from Pulsatillae radix containing the same as therapeutic agents for solid tumors".

And I made this solemn declaration conscientiously believing the same to be true.

This 25th day of June, 2003

Byong Ki SEO  
Byong Ki SEO